

(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **267 495 A1**

4(51) C 07 D 475/08
A 61 K 31/495
A 01 K 47/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WPC 07 D / 308 897 2 (22) 11.11.87 (44) 03.05.89

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Strasse 22/23, Berlin, 1080, DD
(72) Leibnitz, Eberhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Nastke, Rudolf, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Reinisch, Gerhard, Prof. Dr. Dipl.-Chem.; Tschiersch, Bruno, Dr. rer. nat. habil.; Winterfeld, Gisela, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung eines neuen Methotrexat-Derivates mit verminderter Toxizität

(55) Methotrexat, Hydroximethylierung, Antikrebsmittel, Methotrexat-Derivat, Tetrahydroximethylmethotrexat, Cytostatika, Cancerostatikum

(57) Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Herstellung eines neuen Methotrexat-Derivates, eines im medizinischen Bereich, vorzugsweise in der Humanmedizin, eingesetzten Cancerostatikums durch Hydroximethylierung der Aminogruppen des Pteridinringes mit Formaldehyd in wäßrig alkalischer Lösung.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

BEST AVAILABLE COPY

Patentanspruch:

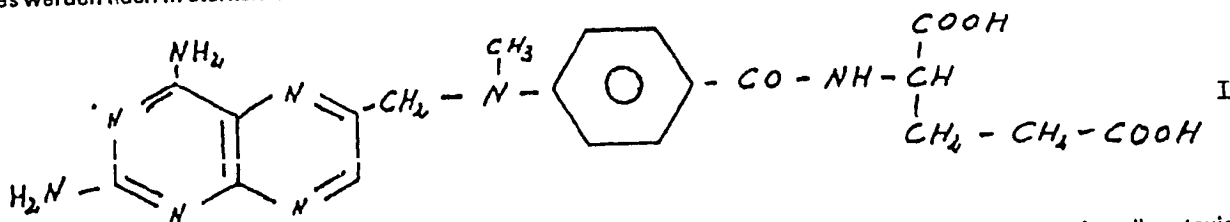
Verfahren zur Herstellung eines neuen Methotrexat-Derivats mit verminderter Toxizität, dadurch gekennzeichnet, daß Tetrahydroximethyl-Methotrexat aus Methotrexat in wäßriger Phase mit 4-10 Mol Formaldehyd Mol Methotrexat bei 303 bis 363K, einem pH-Wert von 7,2 bis 11, 1,5 bis 4 Stunden synthetisiert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines neuen Methotrexat-Derivates, das im medizinischen Bereich, insbesondere in der Humanmedizin, einsetzbar ist.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß das Cytostatikum Methotrexat (MTX) (Formel I) nicht nur auf neoplastisches Gewebe toxisch wirkt, sondern es werden auch in starkem Maße normales Gewebe und gesunde Organe geschädigt.



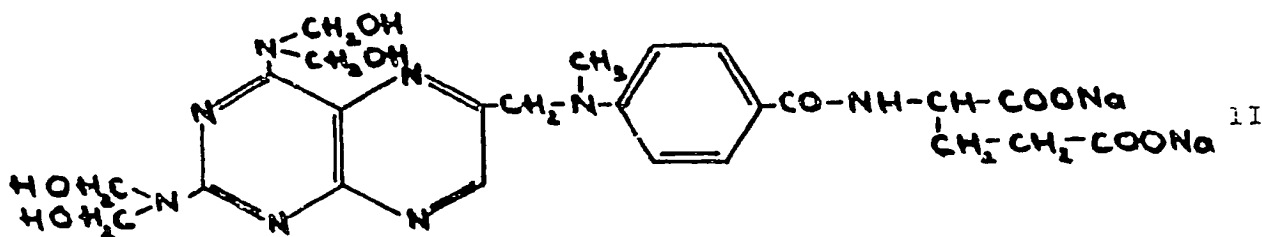
Durch Bindung von Methotrexat an verschiedene natürliche und synthetische Polymere ist versucht worden, diese toxischen Nebenwirkungen herabzusetzen. (Ringsdorf, H., *Angewand. Chemie* 93 [1981], S. 311-332; *Makromol. Chemie* 179 [1978], S. 1719-1733). Dieses Ziel wurde bis heute nicht erreicht. Durch den polymeren Träger hervorgerufene zusätzliche unerwünschte Nebenwirkungen führten dazu, daß diese Materialien im klinischen Test nicht eingesetzt werden konnten. Nach dem gegenwärtigen Stand der Aufklärung des Wirkungsmechanismus des Methotrexats sind für die gewünschte antineoplastische Wirkung, das heißt die Hemmung der Dihydrofolsäurereduktase (DHFR) die freien Aminogruppen in 2- und insbesondere 4-Stellung des Methotrexats (siehe Formel I) unbedingte Voraussetzung. Eine Substitution des Wasserstoffs der Aminogruppen durch Acyl- oder Alkylgruppen, die durch in der organischen Chemie übliche Reaktionen möglich ist, führt zum vollständigen oder teilweisen Verlust der antineoplastischen Wirkung (vgl. „Cancer Medicin“ Hrsg. J.F. Holland, E. Frei, Verlag Lea & Febinger, Philadelphia, USA, 1973, Seite 739 ff.).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Entwicklung eines Verfahrens zur gut reproduzierbaren Herstellung eines neuen Methotrexat-Derivates, das eine verminderte Allgemeintoxizität und verbesserte oder mindestens gleiche Wirkungseffektivität wie das freie MTX aufweisen soll.

Aufgabe der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung eines Methotrexat-Derivates zu entwickeln, bei dem niedermolekulare organische Verbindungen an die NH_2 -Gruppen des Pteridinringes gebunden werden und dessen Produkt eine verbesserte antineoplastische Wirkung besitzen soll. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß durch Umsetzung von 1 Mol mit 4 bis 10 Mol Formaldehyd in alkalischer wäßriger Lösung über einen Zeitraum von 1,5 bis 4 Stunden bei einer Temperatur von 303 K bis 363 K und einem pH-Wert von 7,5 bis 11 ein Tetrahydroximethyl-MTX, Formel II, hergestellt wird.



BEST AVAILABLE COPY

Das Produkt wird isoliert, indem nach Einstellung eines für die Anwendung im lebenden Organismus erforderlichen pH-Wertes zwischen 7,2 und 7,4 durch Zugabe von verdünnter Salzsäure Wasser und überschüssiger Formaldehyd unter vermindertem Druck entfernt werden. Es liegt als gut wasserlösliches Di-natriumsalz vor und kann direkt zur Herstellung von Injektions- oder Infusionslösungen verwendet werden.

Die Substanz wurde im in vivo Screening Test auf ihre antineoplastische Wirksamkeit geprüft, wobei die in Tabelle 1 und 2 zusammengestellten Ergebnisse erhalten wurden.

Untersuchungsmaterial waren BDF₁-Mäuseböckchen (je Testgruppe 10 Tiere). Testtumore waren die Leukämie P 388 und das Melanom B 16. Die Testsubstanz wurde den Tieren intraperitoneal injiziert. Als Vergleichsmaterial diente reines Methotrexat-dinatriumsalz.

Es ist als überraschend zu werten, daß das erfindungsgemäße Produkt trotz der vollständigen Substitution aller Wasserstoffatome der Aminogruppen eine dem freien MTX mindestens vergleichbare und zum Teil sogar signifikant bessere Wirkung als MTX aufweist.

Ausführungsbeispiel

4,98 g (0,01 Mol) Di-natriummethotrexat werden in 100 ml Wasser gelöst und 5,0 ml 30%ige wäßrige Formaldehydlösung (0,05 Mol) zugegeben. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wird mit verdünnter wäßriger Natronlauge auf 9,2 eingestellt und die Lösung unter Rühren auf 323 K erwärmt. Es wird 2,5 Stunden bei dieser Temperatur gerührt, danach die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt und die zur pH-Wert Einstellung auf 9,2 benötigte Menge NaOH durch Zusatz der äquivalenten Menge 1 n HCl neutralisiert.

Durch Entfernen des Wassers und des Formaldehyd-Überschusses unter vermindertem Druck (etwa $1 \cdot 10^3$ Pa) bei max. 303 K erhält man das Tetrahydroximethyl-MTX als Dinatriumsalz.

Es wird im Vakuum ($< 1 \cdot 10^2$ Pa) bei max. 313 K getrocknet.

Das Produkt enthält keine Etherbindungen und keine Methylenbrücken.

Tabelle 1 Lebensdauer von BDF₁-Mäusen nach i. p. Applikation der Leukämie P 388 und nach Applikation der Testsubstanz und von MTX im Vergleich zu unbehandelten tumortragenden Kontrolltieren

Dosis [mg/kg/Inj.]	Applikationstag nach Tumor- inkubation	Testsubstanz	Lebensdauer in Tagen	
			MTX	Kontrolle
80	1.	12	12	10
60	1.	14	10	10
30	1.	11	13	10
20	1.	10	10	10
10	1.-4.	14	6	10
5	1.-4.	14	12	10
2,5	1.-4.	14	14	10

Tabelle 2 Lebensdauer von BDF₁-Mäusen nach i. p. Applikation des Melanoms B 16 und nach Applikation der Testsubstanz und von MTX im Vergleich zu unbehandelten tumortragenden Kontrolltieren

Dosis [mg/kg/Inj.]	Applikationstag nach Tumor- inkubation	Testsubstanz	Lebensdauer in Tagen	
			MTX	Kontrolle
80	1.	34	35	30
60	1.	34	31	30
40	1.	33	29	30
40	1., 5., 9.	34	24	26
20	1., 5., 9.	33	26	26
10	1., 5., 9.	34	26	26

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)